CHAPITRE 2.3.12.

BURSITE INFECTIEUSE
(Maladie de Gumboro)

RÉSUMÉ

La bursite infectieuse aviaire (*IBD*) *est une maladie aviaire causée par un virus appartenant au genre* Avibirnavirus *dans la famille des* Birnaviridae*. Bien que la dinde, le canard, la pintade et l'autruche puissent être occasionnellement infectés, la maladie ne s'exprime cliniquement que chez l'espèce poule. Seuls les jeunes oiseaux expriment la maladie. La forme grave et aiguë de la maladie est associée à une mortalité élevée chez les sujets âgés de 3 à 6 semaines, mais une forme moins aiguë ou subclinique est fréquente entre 0 et 3 semaines d'âge. Elle peut être à l'origine de problèmes secondaires liés à l'effet du virus sur la bourse de Fabricius. Le virus de la bursite infectieuse aviaire (IBDV) provoque une déplétion lymphoïde dans la bourse de Fabricius, qui, si elle survient au cours des deux premières semaines de vie, peut entraîner une diminution significative de l'immunité humorale et des réponses en anticorps. On reconnaît deux sérotypes d'IBDV, qui sont notés 1 et 2. Ils peuvent être différenciés par des tests de séroneutralisation (SN) croisée. Seules les souches du sérotype 1 sont pathogènes et ont été utilisées pour le développement de vaccins. Des variants antigéniques ont été décrits au sein du sérotype 1 et peuvent rendre nécessaire une adaptation du contenu antigénique des vaccins pour une protection optimale. Des souches très pathogènes de virus appartenant au sérotype 1 sont aujourd'hui très répandues dans de nombreux pays.*

La maladie causée par l'infection par l'IBDV, également connue sous le nom de « maladie de Gumboro », peut en général être diagnostiquée sur la base d'une combinaison de symptômes et de lésions nécropsiques caractéristiques. La confirmation au laboratoire du diagnostic, ou le diagnostic de la forme subclinique, peuvent être réalisés par la mise en évidence d'une réponse immunitaire humorale chez des sujets non vaccinés, ou par la détection des antigènes viraux ou du génome viral dans les tissus. En l'absence de tels tests, l'examen histologique de la bourse de Fabricius peut être utile.

Identification de l'agent pathogène : *l'isolement de l'IBDV n'est en général pas pratiqué en routine au laboratoire. Des poulets dépourvus d'anticorps spécifiques peuvent être utilisés à cette fin, tout comme certaines cultures cellulaires ou des œufs embryonnés provenant de reproductrices dépourvues d'anticorps spécifiques de l'IBDV. Des difficultés peuvent être rencontrées avec les deux derniers systèmes de propagation, dans la mesure où l'IBDV ne leur est pas toujours spontanément adapté. L'identité de l'agent viral éventuellement isolé doit ensuite être confirmée par un test de SN.*

L'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) peut être mise en œuvre pour détecter les antigènes viraux dans la bourse de Fabricius : un fragment de la bourse est prélevé, homogénéisé, puis confronté comme antigène à un antisérum de spécificité connue pour l'IBDV. Cette épreuve est particulièrement utile aux phases précoces de l'infection, avant le développement d'une réponse sérologique. Une épreuve d'immunofluorescence basée sur un sérum de poulet spécifique de l'IBDV peut également être utilisée pour détecter les antigènes viraux dans le tissu bursal. Des méthodes de capture antigénique révélées par immunoadsorption à enzyme conjuguée (AC-ELISA) ont aussi été décrites pour la mise en évidence des antigènes viraux dans des homogénats de bourse de Fabricius. La technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) faisant appel à des amorces nucléotidiques spécifiques de l'IBDV peut enfin être mise en œuvre pour la détection de l'ARN viral dans la bourse de Fabricius.

Caractérisation des souches virales : *les souches d'IBDV peuvent être caractérisées de façon plus approfondie par* i) *l'étude de leur pouvoir pathogène pour des poulets dépourvus d'anticorps spécifiques de l'IBDV,* ii) *l'évaluation de leur réactivité antigénique dans des tests de SN croisée ou dans des épreuves faisant appel à des anticorps monoclonaux,* iii) *la détermination de la séquence nucléotidique de produits d'amplification obtenus par RT-PCR à partir du génome viral, ou la caractérisation de ces produits d'amplification grâce au nombre et la taille des fragments libérés après digestion de ces fragments par différentes enzymes de restriction. Plusieurs protocoles ont été publiés pour chacune de ces approches. Les épreuves devraient être conduites par des laboratoires spécialisés et devraient inclure une série de souches virales de référence à titre de témoins. Les bases moléculaires de la variation antigénique sont mieux comprises, mais il n'existe pas encore de marqueur validé pour le caractère pathogène des souches virales.*

Épreuves sérologiques : *les tests d'IDG, de SN ou ELISA peuvent être mis en œuvre sur les échantillons de sérum. L'infection diffuse rapidement au sein des troupeaux infectés, en conséquence il suffit de tester un faible pourcentage de l'effectif pour détecter d'éventuels anticorps. En cas de réponse sérologique positive chez des sujets non préalablement vaccinés, la totalité de l'effectif du troupeau d'origine doit être considérée comme infectée.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *des vaccins vivants à virus atténués et des vaccins adjuvés à virus inactivé sont disponibles pour le contrôle de la maladie. Un vaccin recombiné exprimant la protéine VP2 de l'IBDV a également été enregistré. Il est important que les vaccins vivants soient stables et ne présentent pas de tendance à redevenir virulent à l'occasion de leurs passages successifs d'un animal infecté à un animal sensible. Pour être efficaces, les vaccins à virus inactivés doivent avoir un contenu antigénique élevé.*

Les vaccins à virus vivant sont utilisés pour induire une immunité active chez les jeunes sujets. En complément de cette approche, les jeunes poulets sont protégés passivement grâce à la vaccination des reproductrices à l'aide d'une combinaison de vaccins à virus vivant ou inactivé. La vaccination efficace des troupeaux de reproducteurs est donc d'une grande importance.

Vaccins à virus vivants : différentes souches d'IBDV atténuées sont utilisées. Les vaccins qui les incorporent sont qualifiés de « doux » (mild), « d'intermédiaires » (intermediate), ou « d'intermédiaires plus », « d'invasifs » ou de « chauds » (invasive ou hot). Les vaccins « doux » provoquent des lésions de la bourse de Fabricius très limitées, alors que les vaccins intermédiaires ou invasifs provoquent une déplétion lymphocytaire dans la bourse de Fabricius. Normalement, aucun des vaccins ne provoque une immunodépression lorsqu'il est administré à des sujets âgés de plus de 14 jours qui sont issus de reproductrices immunisées contre l'IBDV.

Les vaccins « doux » sont rarement utilisés chez le poulet de chair, mais sont largement mis en œuvre pour la primovaccination des troupeaux de reproducteurs de poulets de chair avant qu'ils ne reçoivent une vaccination de rappel effectuée par injection à l'aide d'un vaccin à virus inactivé. Les vaccins « intermédiaires » et « chauds » sont capables de mieux traverser la barrière des anticorps d'origine maternelle. Les vaccins vivants sont, en général, administrés par nébulisation ou via l'eau de boisson. En l'absence d'anticorps d'origine maternelle, les vaccins doux peuvent être administrés à l'âge de un jour. Lorsqu'ils sont présents à l'âge de 1 jour, la vaccination devrait être retardée jusqu'à ce qu'ils aient disparu chez la plupart des sujets. Le meilleur programme peut être déterminé grâce à une analyse sérologique cinétique destinée à préciser à quel moment les anticorps d'origine maternelle auront atteint un seuil suffisamment bas. Plus récemment, des vaccins vivants ont été développés afin de permettre leur administration par injection in ovo *au 18^{e} jour d'incubation.*

Vaccins à virus inactivé : ils sont le plus souvent utilisés pour induire des niveaux immunitaires élevés et homogènes chez les reproducteurs, de façon à obtenir un niveau élevé et uniforme d'anticorps d'origine maternelle chez la descendance. Les vaccins à virus inactivés peuvent également être injectés, de façon plus occasionnelle, chez des sujets jeunes de valeur et porteurs d'anticorps d'origine maternelle. Les vaccins à virus inactivés se présentent sous la forme d'une émulsion associant le vaccin et un adjuvant huileux, ils sont administrés par injection. Ils sont destinés à une utilisation chez des sujets préalablement sensibilisés soit par l'administration d'un

vaccin vivant, soit par l'exposition à un virus sauvage. La primo-exposition peut être objectivée par un contrôle sérologique avant injection. Des niveaux élevés d'anticorps d'origine maternelle peuvent être obtenus par exemple en administrant aux futurs reproducteurs un vaccin à virus vivant vers 8 semaines d'âge, suivi d'une injection de vaccin à virus inactivé vers l'âge de 18 semaines.

A. INTRODUCTION

La bursite infectieuse aviaire (IBD pour *Infectious Bursal Disease*) est causée par un virus non enveloppé, dont le génome est constitué de deux segments d'ARN bicaténaire et qui appartient au genre *Avibirnavirus* au sein de la famille des *Birnaviridae*. Bien que la dinde, le canard, la pintade et l'autruche puissent être infectés, la maladie ne s'exprime cliniquement que chez l'espèce poule. Seuls les jeunes oiseaux expriment la maladie. La forme grave et aiguë de la maladie est associée à une mortalité élevée chez les sujets âgés de 3 à 6 semaines, mais une forme moins aiguë ou subclinique est fréquente entre 0 et 3 semaines d'âge. Elle peut être à l'origine de problèmes secondaires liés à l'effet du virus sur la bourse de Fabricius. Le virus de la bursite infectieuse aviaire (IBDV) provoque une déplétion lymphoïde dans la bourse de Fabricius, qui, si elle survient au cours des deux premières semaines de vie, peut entraîner une diminution significative de l'immunité humorale et des réponses en anticorps. Deux sérotypes d'IBDV, notés 1 et 2, sont connus. Les virus de sérotype 1 peuvent provoquer la maladie chez les poulets et poulettes de moins de 10 semaines d'âge. Les sujets plus âgés ne présentent pas en général de signes cliniques. Des anticorps ont parfois été mis en évidence chez d'autres espèces aviaires, mais sans que l'infection ne s'exprime cliniquement. Les anticorps dirigés contre les virus de sérotype 2 sont très répandus chez la dinde et sont parfois mis en évidence chez le poulet ou le canard. Les infections par les IBDV de sérotype 2 n'ont donné lieu à aucun cas clinique documenté (20).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

L'isolement et l'identification de l'agent causal procurent un diagnostic de certitude de l'IBD, mais ne sont en général pas mis en œuvre en routine car le virus peut s'avérer difficile à isoler (25). En pratique, le diagnostic de laboratoire repose sur la détection des anticorps spécifiques du virus, ou sur la mise en évidence du virus dans les tissus grâce à des techniques immunologiques ou moléculaires.

1. Identification de l'agent pathogène

L'IBD cliniquement exprimée s'accompagne de symptômes et de lésions nécropsiques caractéristiques. Un troupeau affecté présentera une morbidité très élevée accompagnée d'une prostration sévère de la plupart des animaux durant 5 à 7 jours. La mortalité s'élève brusquement pendant 2 jours puis décline rapidement durant les 2 à 3 jours suivants. Habituellement, la mortalité varie de 5 à 10 %, mais elle peut atteindre 30 à 40 %. Les principaux symptômes sont une diarrhée aqueuse, des plumes ébouriffées, une mobilité réduite, de l'anorexie, des tremblements et une prostration. Les lésions observables à l'examen nécropsique incluent une déshydratation très apparente au niveau des muscles, qui présentent également de nombreuses hémorragies et ecchymoses, une hypertrophie et une décoloration des reins, avec une accumulation de cristaux d'urates dans les tubules. C'est la bourse de Fabricius qui présente les lésions essentielles pour le diagnostic : chez les sujets qui meurent en phase aiguë de l'infection, la bourse de Fabricius est hypertrophiée, turgescente, avec une décoloration jaune pâle. Des hémorragies intrafolliculaires peuvent être présentes et dans certains cas la bourse de Fabricius peut être totalement hémorragique et prendre l'aspect d'un caillot de sang (« cerise noire »). Un œdème péribursal de couleur jaune paille est présent chez de nombreux sujets. La confirmation du diagnostic, ou le diagnostic des formes subcliniques de l'infection sera de préférence entrepris à l'aide de techniques immunologiques ou moléculaires car l'IBDV est difficile à isoler. Pour l'isolement, les techniques décrites ci-après pourront être suivies. L'identification différentielle des sérotypes 1 et 2 de l'IBDV, ou celle des variants antigéniques ou pathotypiques au sein du sérotype 1, est du ressort de laboratoires spécialisés tels que les Laboratoires de référence de l'OIE pour la bursite infectieuse aviaire (se reporter à la liste dans la Partie 3 de ce *Manuel terrestre*).

a) Préparation de l'échantillon

Prélever aseptiquement la bourse de Fabricius chez environ 5 sujets malades autopsiés pendant la phase précoce de la maladie. Hacher les bourses avec deux scalpels, ajouter une petite quantité de bouillon peptoné contenant de la pénicilline et de la streptomycine (1 000 µg/ml de chaque antibiotique), et homogénéiser dans un broyeur de tissus. Centrifuger l'homogénat à 3 000 ***g*** pendant 10 min. Recueillir le surnageant qui sera utilisé pour les essais décrits ci-après. La filtration du surnageant à travers un filtre de porosité 0,22 µm peut s'avérer nécessaire pour contrôler au mieux les contaminants bactériens éventuellement présents dans la suspension virale, mais cette procédure entraîne une réduction du titre viral de la suspension.

b) Identification par immunodiffusion en gélose

Un protocole pour l'épreuve d'immunodiffusion en gélose (IDG) est décrit au paragraphe B.2.a. Pour la détection de l'antigène viral dans la bourse par IDG, les bourses doivent être prélevées aseptiquement chez environ 10 poulets présentant les symptômes de la phase aiguë de l'infection. Les bourses sont hachées à l'aide de deux scalpels actionnés comme des ciseaux, puis de petits fragments de bourse sont déposés dans les puits de la plaque de gélose, et sont confrontés à un antisérum dont la spécificité anti-IBDV est connue. Des cycles de congélation-décongélation des tissus hachés peuvent améliorer la libération des antigènes de l'IBDV par les tissus bursaux infectés et l'exsudat de congélation-décongélation peut être utilisé pour remplir les puits.

c) Identification par immunofluorescence

Des coupes ultrafines de la bourse sont préparées à l'aide d'un cryomicrotome, puis sont séchées à température ambiante et fixées dans l'acétone froide. Un antisérum spécifique de l'IBDV et marqué à la fluorescéine est déposé sur les coupes, qui sont ensuite incubées à 37 °C pendant 1 h en atmosphère humide. À la fin de la période d'incubation, les coupes sont lavées pendant 30 min à l'aide d'une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,2, puis sont rincées à l'eau distillée. Les sections sont montées sous lamelle en utilisant du glycérol tamponné à pH 7,6, puis elles sont examinées en microscopie sous lumière ultraviolette pour recherche d'une fluorescence spécifique de l'IBDV (27).

d) Identification par capture antigénique révélée par la méthode immuno-enzymatique (ac-ELISA)

Plusieurs protocoles ont été décrits pour la détection des souches d'IBDV de sérotype 1 grâce à des tests ac-ELISA (12, 19, 36). En résumé, les puits de plaques ELISA sont sensibilisés avec un anticorps anti-IBDV. Selon le protocole choisi, cet anticorps de capture peut être soit un anticorps monoclonal (AcM) murin anti-IBDV, soit un mélange de plusieurs de ces AcMs, soit un sérum post-infectieux de poulet infecté par l'IBDV. Il a été suggéré que les tests d'ac-ELISA basés sur la capture par des anticorps polyclonaux pourraient avoir une plus grande sensibilité. Les échantillons d'homogénats de bourse (voir ci-dessus) sont dilués du 1/10 au 1/25 (w/v) dans un tampon de dilution approprié, puis sont incubés dans les puits de la plaque ELISA sensibilisée. À l'issue de cette incubation, les antigènes non capturés par les anticorps sont rejetés par lavage avec un tampon approprié (tel que par exemple le PBS, pH 7,2 + 0,2 % Tween 20). Les antigènes capturés sont ensuite mis en évidence, comme dans un test ELISA indirect, avec un anticorps détecteur (qui doit avoir été produit sur une espèce animale autre que celle de l'anticorps de capture), suivi par un conjugué enzymatique spécifique de l'anticorps détecteur (dans certains protocole, l'anticorps détecteur est directement couplé à l'enzyme), lui même suivi par le substrat chromogène de l'enzyme. Finalement, les absorbances (ou densités optiques) – qui sont fonction de la quantité d'antigènes IBDV initialement capturée – sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre ou lecteur ELISA.

Le test ac-ELISA repose sur l'emploi d'échantillons susceptibles de contenir du virus vivant et devrait donc être mis en œuvre dans des locaux d'un niveau de confinement approprié tel qu'un poste de sécurité microbiologique de classe II. Tous les déchets liquides (tampons de lavage) et solides doivent être considérés comme contaminés par l'IBDV et décontaminés en conséquence avant élimination.

Les étapes critiques dans la mise en œuvre et l'évaluation de l'ac-ELISA consistent en i) la nécessité d'un lavage poussé entre chacune des étapes pour limiter le bruit de fond, ii) la nécessité d'inclure à titre de témoin des échantillons positif et négatif de référence dans chaque essai et iii) la nécessité que l'anticorps de capture et l'anticorps de détection réagissent tous les deux positivement avec toutes les souches virales de sérotype 1 (c'est-à-dire que ni la phase de capture, ni la phase de détection du test ne devraient être affectées de façon critique par les variations antigéniques susceptibles de survenir entre souches de sérotype 1).

e) Identification par les techniques moléculaires

Des techniques de virologie moléculaire ont été développées pour permettre de détecter l'IBDV plus rapidement que par isolement viral (8, 16, 43). La méthode moléculaire la plus utilisée est la détection du génome de l'IBDV par transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) (24, 43). Cette méthode peut détecter le génome de l'IBDV même si la souche étudiée n'est pas adaptée à la culture cellulaire, car il n'est pas nécessaire de cultiver le virus avant la RT-PCR.

Les protocoles de base pour la RT-PCR comprennent trois étapes : l'extraction des acides nucléiques à partir de l'échantillon étudié, la transcription inverse de l'ARN viral en ADNc, puis l'amplification de l'ADNc par PCR. Les deux dernières étapes exigent que l'utilisateur définisse des amorces oligonucléotidiques qui consistent en de courtes séquences complémentaires et spécifiques de la séquence nucléotidique du génome viral. Différentes régions du génome viral peuvent être amplifiées selon la position dans le génome des amorces qui ont été sélectionnées. Les exemples ci-dessous permettent l'amplification dans l'un des

segments génomiques du virus (segment A) du tiers moyen du gène codant la protéine de capside externe VP2 (9, 10).

- **Extraction des acides nucléiques**

L'ARN simple brin est extrêmement sensible à la dégradation par les RNAses. Le génome de l'IBDV constitué d'ARN double brin résiste à la dégradation par les RNAses. Toutefois, les cellules infectées contiennent aussi des ARN simple brin de polarité positive dérivés du génome de l'IBDV, qui pourraient être utilisés comme matrice dans l'étape de RT et contribuer ainsi à améliorer la sensibilité de l'épreuve. Il est donc important que l'extraction d'ARN soit réalisée par un personnel muni de gants et utilisant des réactifs et du matériel de laboratoire non contaminés par les RNAses.

L'ARN de l'IBDV peut être extrait des tissus infectés à l'aide de kits de diagnostic commercialisés par les producteurs de réactifs pour la biologie moléculaire. Le protocole suivant est une alternative : ajouter 1 % (poids/volume de concentration finale) de SDS (sodium dodecyl sulphate) et 1 mg/ml de protéinase K à 700 µl de suspension virale (par exemple un homogénat bursal). Incuber pendant 60 min à 37 °C. Les acides nucléiques sont ensuite obtenus en suivant un protocole normalisé d'extraction au phénol/chloroforme (attention : le phénol est toxique et devrait être manipulé et éliminé en conséquence). Les acides nucléiques sont recueillis à partir de la dernière phase aqueuse, par précipitation à l'éthanol, et sont remis en suspension dans de l'eau distillée ou un tampon approprié dépourvus de RNAse. Jusqu'à utilisation, les ARN en solution dans l'eau doivent être conservés congelés à une température inférieure à -20 °C.

- **Transcription inverse**

Plusieurs transcriptases inverses sont disponibles chez des fournisseurs commerciaux. Suivre les recommandations du fournisseur pour préparer le mélange réactionnel. Utiliser l'amorce « antisens » (complémentaire du brin positif du génome de l'IBDV, voir ci-après) à l'étape de transcription inverse, dans la mesure où cela permet la synthèse d'un ADN complémentaire à la fois à partir du brin positif du génome viral et à partir des ARN simples brins de polarité positive également contenus dans les cellules infectées. Une autre solution consiste à utiliser des amorces au hasard (hexanucléotides) pour démarrer la synthèse de l'ADNc,

La matrice ARN issue de l'IBDV doit être dénaturée avant d'être ajoutée au mélange réactionnel de RT. Ajouter 1 volume de diméthylsulfoxyde (de niveau de pureté « biologie moléculaire ») à 4 volumes de la solution d'ARN viral préalablement décongelée. Chauffer pendant 3 min à 92 °C et refroidir rapidement sur la glace ; une autre méthode possible consiste à chauffer pendant 5 min puis à refroidir immédiatement le mélange par trempage dans l'azote liquide. Transférer le volume requis de matrice dénaturée dans le mélange de RT. Incuber selon les recommandations du fournisseur de l'enzyme.

La solution d'ADNc obtenue à l'issue de l'étape de RT devrait être conservée congelée à une température inférieure à –20 °C. Différer de plusieurs semaines l'analyse par PCR peut être à l'origine de l'obtention de résultats de PCR faussement négatifs.

- **Amplification en chaîne par polymérase**

Différentes ADN polymérases utilisables en PCR sont disponibles commercialement. Suivre les recommandations du fournisseur pour préparer le mélange réactionnel de PCR. Les protocoles pour l'amplification et le typage moléculaire de l'IBDV ont récemment été abordés (44). Ainsi par exemple, les paires d'amorces pour PCR présentées ci-dessous, U3/L3 dune part et +290/-861 d'autre part, peuvent être proposées car elles se sont révélées utiles pour amplifier respectivement le tiers central du gène de la VP2 dans le segment A du sérotype 1 (9, 10), et une région à l'extrémité 5' du segment B (21). Les deux régions conviennent bien aux études d'épidémiolgie moléculaire (22). Bien qu'un certain nombre des souches de l'IBDV aient deux modifications de nucléotides respectivement en positions 35 (G-A) et 38 (T-C) par rapport à l'amorce U3 (y compris les isolats en provenance du Japon [OKYM], Hong Kong [HK46], Royaume Uni [UK661] et Nigeria [N4]), il a été démontré que la paire d'amorces U3-L3 amplifie avec succès certains des virus qui présentent les deux mutations. Cela est vraisemblablement dû au fait que l'extrémité 3' de U3 est fortement conservée. Cependant, comme pour la plupart des épreuves de PCR, il peut exister des souches d'IBDV présentant des modifications nucléotidiques dans les régions d'appariement des amorces, ce qui peut nécessiter l'utilisation d'autres amorces pour optimiser la détection par RT-PCR.

L'association de protocoles de RT-PCR ciblant le segment A et le segment B augmente la probabilité de détecter l'IBDV sérotype 1 quand il est présent ; elle permet aussi une caractérisation génétique poussée des souches d'IBDV détectées.

Séquences nucléotidiques des amorces U3 et L3 (spécifiques pour le segment A, gène de la VP2) :

Sens U3 : 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT**-GCA-TGC-*GGT-ATG-TGA-GGC-TTG-GTG-AC*-3'

Antisens : 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC**-GAA-TTC-*GAT-CCT-GTT-GCC-ACT-CTT-TC*-3'

Séquences nucléotidiques des amorces +226 et –793 (spécifiques pour le segment B, gène de la VP1) :

Sens +290 : 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-**GAA-TTC**-***AGA-TTC-TGC-AGC-CAC-GGT-CTC-T*-3'

Antisens -861 : 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC**-CTG-CAG**-***TTG-ATG-ACT-TGA-GGT-TGA-TTT-TG*-3'

Les amorces oligonucléotidiques U3 et L3 comprennent toutes les deux 44 nucléotides, alors que les amorces +290 et –861 comprennent respectivement 46 et 47 nucléotides. Les quatres amorces comportent une extrémité 3' spécifique de l'IBDV, indiquée en italiques dans les séquences ci-dessus. Les portions spécifiques de l'IBDV correspondent aux positions nucléotidiques 657 à 676 et 1193 à 1212 du segment A de l'IBDV, pour les amorces U3 et L3 (numérotation des positions nucléotidiques comme dans le segment A de la souche P2, Acc No X84034), et aux positions nucléotidiques 290 à 311 et 861 à 883 du segment B de l'IBDV pour les amorces +290 et –861 (numérotation des positions nucléotidiques comme dans le segment B de la souche D6948, Acc No AF240687). La séquence spécifique de l'IBDV est couplée à une séquence non-IBDV localisée à l'extrémité 5' de l'amorce (en caractère gras ou souligné dans les séquences ci dessus). Cette séquence non-IBDV correspond à l'amorce universelle M13 dans les amorces sens ou M13 inverse (RM13) dans les amorces antisens. Les amorces universelles M13 et RM13 sont couramment utilisées comme amorces dans les réactions de séquençage de l'ADN, de sorte que les produits d'amplification obtenus avec les amorces U3/L3 et +290/–861, une fois purifiés, peuvent être facilement séquencés dans les deux sens. Enfin, des sites de restriction (soulignés dans les séquences ci-dessus) sont inclus pour les endonucléases de restriction suivantes : *Sph*I (dans l'amorce U3), *Eco*RI (dans les amorces L3 et +290), et *Pst* I (dans l'amorce –861). Ces sites de restriction sont positionnés dans les amorces de façon à ce que les produits d'amplifications obtenus avec les paires U3/L3 ou +290/–861 puissent être clonés si nécessaire. La paire d'amorces U3/L3 génère un produit d'amplification de 604 paires de bases, dont 516 pb sont spécifiques de la séquence amplifiée et incluent la région codant le domaine hypervariable de la protéine VP2. La paire d'amorces +290/–861 génère un produit de 642 pb, dont 549 pb sont spécifiques de la séquence amplifiée. Les deux produits sont dérivés de régions génomiques qui conviennent pour l'analyse phylogénétique (9, 10, 21, 22).

Réaliser une étape de dénaturation initiale comme recommandé par le fournisseur de l'ADN polymérase, suivie de 35 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation, une étape d'appariement et une étape d'élongation. Dans ces cycles, une dénaturation à 95 °C pendant 30 s et un appariement à 64 °C pendant 45 s peuvent être utilisés avec les deux paires d'amorces U3/L3 et +290/–861 (la température d'appariement devra être adaptée si d'autres amorces sont utilisées). Les paramètres de l'étape d'élongation devraient être définis selon les recommandations du fournisseur de l'ADN polymérase.

La réaction peut être révélée par électrophorèse des produits d'amplification et de marqueurs de taille des fragments ADN dans un gel à 1 % d'agarose, coloré au bromure d'éthidium (Attention : le bromure d'éthidium est toxique et cancérigène. Il devrait être manipulé et éliminé en conséquence).

Trois réactions de PCR devraient être réalisées pour chaque échantillon d'ADNc (pur, dilué au 1/10 et dilué au 1/100) pour éviter des résultats faussement négatifs liés à l'inhibition de la réaction PCR du fait de quantités trop importantes d'ADNc dans le mélange réactionnel.

Chaque réaction PCR devrait inclure des réactions témoins positive et négative. Des protocoles incluant un témoin interne destiné à objectiver la présence d'inhibiteurs de la PCR dans l'échantillon testé ont été proposés (35).

Différer la réaction PCR pendant plusieurs semaines après l'étape de RT peut conduire à obtenir des résultats PCR faussement négatifs.

f) Isolement viral en culture cellulaire

Inoculer 0,5 ml de l'échantillon sur chacune des quatre cultures de fibroblastes embryonnaires de poulet (CEF pour *Chicken Embryo Fibroblast*) récemment parvenues à confluence du tapis cellulaire et préparées à partir d'œufs embryonnés exempts d'agents pathogènes spécifiques (EAPS), dans des flacons de 25 cm^2. Après 30 à 60 min d'adsorption à 37 °C, laver les tapis cellulaires 2 fois à l'aide de solution tamponnée au sel d'Earle et ajouter du milieu de survie dans chaque flacon. Incuber les cultures à 37 °C en observant quotidiennement jusqu'à apparition de l'effet cytopathogène (ECP). Celui-ci se caractérise par l'apparition de petites cellules rondes et réfringentes. Si aucun ECP n'est observé après une période d'incubation de 6 jours, rejeter le milieu de culture, puis congeler et décongeler les tapis cellulaires et réinoculer le lysat obtenu à des cultures cellulaires fraîches. Ce protocole peut devoir être répété au moins 3 fois. Si un ECP

est observé, il convient de confronter le virus à un antiserum spécifique de l'IBDV dans un test de séroneutralisation virale révélée sur culture de cellules (voir ci-après). Les souches d'IBDV les plus pathogènes ne peuvent en général être adaptées à la culture en CEF, à moins que le virus ait d'abord été soumis à un nombre important de passages en série sur œuf embryonné (voir ci-dessous).

g) Isolement viral sur œuf embryonné

Inoculer 0,2 ml d'échantillon par voie intravitelline à cinq œufs de poule embryonnés, dépourvus d'anticorps spécifiques et âgés de 6 à 8 jours, et par voie chorio-allantoïdienne (1) à cinq autres œufs de poule embryonnés dépourvus d'anticorps spécifiques et âgés de 9 à 11 jours. Les embryons dépourvus d'anticorps spécifiques peuvent être obtenus à partir de troupeaux dont la séronégativité vis-à-vis de l'IBDV a été démontrée. Mirer chaque jour et rejeter les embryons morts dans les 48 h suivant l'inoculation. Les lésions embryonnaires sont recherchées chez les embryons qui meurent ensuite. Les souches d'IBDV de sérotype 1 produisent un nanisme de l'embryon, un œdème sous-cutané, une congestion et des hémorragies sous cutanées ou intra-crâniennes. Le foie est habituellement hypertrophié, avec des tâches de congestion lui donnant un aspect marbré. En cas de mort tardive, le foie peut être hypertrophié et verdâtre, avec des zones de nécrose. Le volume de la rate est augmenté et les reins sont hypertrophiés et congestifs, d'aspect marbrés. Lorsque des lésions embryonnaires sont présentes, le virus devrait alors être confronté à un antisérum spécifique de l'IBDV dans un test de SN révélé sur œuf embryonné.

Les souches d'IBDV de sérotype 1 provoquent en général la mort d'au moins quelques-uns des œufs inoculés au premier passage.

Les souches d'IBDV de sérotype 2 ne provoquent ni œdème sous-cutané ni hémorragies chez les embryons infectés, qui apparaissent au contraire de taille réduite et présentent une décoloration jaune pâle.

Pour la préparation de stock virus propagés sur œufs embryonnés ou avant réalisation d'un nouveau passage viral sur embryon, les embryons lésés ou dont l'infection est suspectée sont prélevés de façon stérile. Leur tête et leurs membres sont rejetés et leur corps est ensuite broyé comme décrit à la section B.1.a pour la préparation d'une suspension virale.

h) Isolement du virus chez le poulet

Cette méthode a été utilisée dans le passé mais n'est plus recommandée compte-tenu des impératifs de respect du bien-être animal. Cinq poulets sensibles (âgés de 3 à 7 semaines) et trois poulets de même âge présentant des anticorps contre l'IBDV sont inoculés par administration d'une goutte dans l'œil avec 0,05 ml d'échantillon. Les poulets sont euthanasiés 72 à 80 h après inoculation, et les bourses de Fabricius sont examinées. Les bourses de Fabricius des poulets infectés avec les souches pathogènes d'IBDV de sérotype 1 apparaissent jaunâtres et oedématiées (parfois hémorragiques), leurs stries sont très apparentes. Un œdème est parfois présent autour de la bourse, et des amas durcis de caséum sont parfois trouvés dans la bourse. Les plis de la bourse présentent des pétéchies.

La présence de lésions de la bourse chez les sujets sensibles, accompagnée de l'absence de lésions chez les sujets immunisés assure le diagnostic de l'IBD. Les bourses de Fabricius prélevées chez les sujets des deux groupes peuvent être utilisées comme antigènes dans une épreuve d'IDG, dans lequel elles seront confrontées à un antisérum monospécifique de l'IBDV (voir Section B.1.b).

L'importance des lésions de la bourse peut varier considérablement avec le pouvoir pathogène de la souche d'IBDV étudiée. Néanmoins, comme les échantillons soumis pour l'isolement viral sont susceptibles de varier dans leur titre viral, la sévérité des lésions bursales observées à l'étape de l'isolement viral ne donne que des renseignements limités sur le pouvoir pathogène de la souche étudiée.

Les bourses de Fabricius des poulets infectés par les souches d'IBDV appartenant au sérotype 2 ne présentent pas de lésions macroscopiques.

i) Identification des souches virales

Les souches d'IBDV peuvent être caractérisées plus avant en évaluant leur pouvoir pathogène chez des poulets sensibles, en caractérisant leur réactivité antigénique dans des tests de SN croisée ou à l'aide d'anticorps monoclonaux, enfin en déterminant leur séquence nucléotidique à partir des produits d'amplification obtenus par RT-PCR, ou en étudiant le polymorphisme des fragments de restriction obtenus après digestion de ces produits d'amplification à l'aide d'endonucléases de restriction. Différents protocoles ont été décrits pour chacune de ces approches. De tels tests devraient être conduits par des laboratoires spécialisés et devraient inclure une série de souches virales de référence à titre de témoins. Bien que les bases moléculaires de la variation antigénique soient maintenant mieux comprises, il n'existe pas encore de marqueur de virulence validé.

- **Étude du pouvoir pathogène**

Les études destinées à comparer le pouvoir pathogène des souches d'IBDV doivent être réalisées dans des locaux expérimentaux confinés de façon à ne pas disséminer le virus étudié (voir Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries », concernant les échanges internationaux et le confinement au laboratoire des agents pathogènes pour les animaux). Des poulets SAN ayant un statut microbiologique connu (idéalement des poulets EAPS) doivent être utilisés pour éviter des interférences dues à d'autres agents contaminants.

Les principales variables à prendre en compte lors de la comparaison des essais destinés à mesurer le pouvoir pathogène sont la souche, l'âge et le statut immunitaire des poulets éprouvés, la dose et la voie d'inoculation du virus d'épreuve et la présence d'éventuels agents contaminants dans l'inoculum. Les souches légères de poule pondeuse ont été décrites comme étant plus sensibles que les races plus lourdes utilisées pour la production du poulet de chair (42). Des différences de sensibilité peuvent aussi être observées entre différentes lignées de poulets EAPS. Le poulet présente une sensibilité maximale à l'IBD entre 3 et 6 semaines d'âge (25) (L'influence du statut immunitaire est décrite à la Section C). Une dose de virus d'épreuve élevée, telle que celle décrite à la Section C.1.c, est nécessaire de façon à ce que les poulets inoculés se contaminent tous simultanément sans qu'un passage du virus d'oiseau à oiseau soit nécessaire. Enfin, la présence dans l'inoculum d'agents contaminants, tels que les adénovirus ou le virus de l'anémie infectieuse aviaire, peut modifier la sévérité de l'IBD et la nature des symptômes observés après l'épreuve (32).

Les qualificatifs de « variant », « classique » ou « hypervirulent » ont été utilisés pour décrire des souches d'IBDV présentant différents niveaux de pouvoir pathogène. Sur la base des symptômes et lésions observés chez deux lignées génétiques de poulets EAPS de souche White Leghorn après épreuve à l'aide de 10^5 doses de virus infectant 50 % des embryons (DIE_{50}), les « variants » nords-américains n'induisent que peu ou pas de signes cliniques et pas de mortalité, mais des lésions de la bourse marquées, les IBDV « classiques » induisent environ 10 à 50 % de mortalité avec des symptômes et lésions typiques, alors que les IBDV « hypervirulents » induisent environ 50 à 100 % de mortalité avec des signes et lésions typiques (Eterradossi *et al.,* observation personnelle).

- **Étude de l'antigénicité**

Les parentés antigéniques entre souches d'IBDV peuvent être étudiées par des tests de SN croisée, qui présentent la meilleure corrélation avec la protection croisée. Ces tests doivent être pratiqués en utilisant des œufs embryonnés SAN quand les virus étudiés ne peuvent être cultivés en CEF (c'est par exemple le cas des IBDV hypervirulents [vvIBDV]). Des différences dans les réponses en SN croisée des souches d'IBDV de sérotype 1 ont conduit à définir des sous-types au sein du sérotype 1, certains de ces sous-types incluant les souches d'IBDV nord-américaines antigéniquement « variantes » (15).

Une autre approche dans l'étude des parentés antigéniques consiste en l'utilisation d'AcMs murins qui se lient aux épitopes de l'IBDV en neutralisant le virus. Plusieurs collections d'AcM existent dans le monde (12, 13, 37). Certains AcMs ont été inclus dans des kits de diagnostic commercialement disponibles, mais une collection unifiée de référence n'a pas encore été proposée. Tous les épitopes de l'IBDV permettant la neutralisation virale décrits jusqu'à présent ont été cartographiés dans un domaine immunogène principal constitué par le tiers moyen (acides aminés 200 à 340) de la protéine de capside externe VP2 (10, 33, 40). Cette région est qualifiée de « domaine variable de VP2 » (vVP2) car la plupart des changements aminopeptidiques observés entre souches d'IBDV y sont regroupés. Au sein de VP2, quatre séries d'acides aminés critiques pour l'antigénicité sont désignés comme les « pics hydrophiles de VP2 ». Ce sont les positions aminopeptidiques 210 à 225 (pic majeur A), 249 à 252 (pic mineur 1), 281 à 292 (pic mineur 2) et 313 à 324 (pic majeur B) (2, 41). Les souches d'IBDV nord-américaines antigéniquement « variantes » et « hypervirulentes » présentent au niveau de ces positions des mutations aminopeptidiques corrélées avec les variations des épitopes neutralisants (9, 40). À ce jour, aucun marqueur antigénique ne s'est avéré strictement corrélé au pouvoir pathogène de l'IBDV.

- **Identification moléculaire**

L'essentiel des efforts de caractérisation moléculaire a été focalisé sur la caractérisation du plus grand segment génomique de l'IBDV (segment A) et tout particulièrement de la région codant vVP2. Plusieurs protocoles ont été publiés pour la caractérisation des produits d'amplification à l'aide d'endonucléases de restriction. Ces approches sont désignées sous les acronymes RT-PCR/RE ou RT-PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – polymorphisme de longueur des fragments de restriction) (17, 24, 46). L'utilité de l'information qu'ils procurent dépend de l'identification d'enzymes de restriction coupant dans des zones du génome ayant une signification pour le phénotype viral. Certains sites impliqués dans l'antigénicité ont été identifiés (voir ci-dessus), mais des sites de restriction liés de façon fiable à la virulence restent à identifier et à valider. Le séquençage nucléotidique des produits d'amplification obtenus par RT-PCR, bien que plus coûteux que la restriction enzymatique, propose une approche permettant d'apprécier plus

précisément les parentés génétiques entre les souches d'IBDV. Des marqueurs ont été identifiés expérimentalement, à l'aide d'une approche par génétique inverse, qui permettent de reconnaître les souches d'IBDV adaptées à la culture cellulaire, lesquelles présentent les paires d'acides aminés 279 N-284 T (23) ou 253 H-284 T (28). Chez la plupart des IBDV « hypervirulents », quatre acides aminés typiques sont présents (222 A, 256 I, 294 I et 299 S) (3, 9, 24). Toutefois, il n'est pas encore établi si ces acides aminés jouent un rôle dans la virulence ou s'ils constituent seulement une indication de l'origine clonale de la plupart des vvIBDV. Plusieurs études récentes suggèrent que bien que VP2 soit un facteur de virulence important, cette protéine pourrait ne pas être le seul (4). Il a été décrit que les segments génomiques A et B de l'IBDV co-évoluent principalement (c'est-à-dire que la plupart des groupes de souches phylogénétiquement significatifs, dont les souches apparentées aux vvIBDV, peuvent être identifiées par l'analyse de leurs deux segments génomiques), mais des virus potentiellement réassortants ont été identifiés (21).

2. Épreuves sérologiques

a) Épreuve d'immunodiffusion en gélose

L'IDG est la plus utile des épreuves sérologiques pour détecter les anticorps spécifiques dans le sérum, ou pour détecter les antigènes viraux ou les anticorps dans les tissus de la bourse de Fabricius.

Les prélèvements sanguins devraient être réalisés tôt lors de l'apparition de la maladie et le prélèvement devrait être répété 3 semaines plus tard. Le virus diffusant rapidement, il suffit de prélever une faible proportion des animaux au sein d'un troupeau. Habituellement 20 prises de sang suffisent. Pour la recherche de l'antigène viral dans la bourse de Fabricius, les bourses devraient être prélevées stérilement sur environ dix poulets en phase aiguë de l'infection. Les bourses sont hachées à l'aide de deux scalpels avec des mouvements de ciseaux, puis de petits fragments de tissus sont déposés dans les puits de la plaque de gélose et sont confrontés à un antisérum de positivité connue vis-à-vis de l'IBDV. Des cycles de congélation/décongélation des tissus hachés peuvent améliorer le relargage des antigènes de l'IBDV à partir des tissus bursaux infectés.

- **Préparation de l'antigène positif de référence**

Inoculer des poulets sensibles âgés de 3 à 5 semaines, par gouttes dans l'œil, avec une suspension clarifiée d'homogénat bursal (10 % poids/vol) connue pour contenir des particules viables d'IBDV[1]. Euthanasier les poulets 3 jours après inoculation et récolter les bourses stérilement. Rejeter les bourses hémorragiques et mélanger les autres, peser et ajouter un volume équivalent d'eau distillée froide (ou d'un tampon approprié tel que du PBS ou un bouillon tryptose phosphate) et un volume équivalent de chlorure de méthylène non dilué (Attention : le chlorure de méthylène est toxique et suspecté d'être cancérigène. Il devrait être manipulé et éliminé en conséquence. Une alternative possible permettant d'éviter les risques pour la santé du manipulateur est d'utiliser du trichlorotrifluoroethane). Homogénéiser soigneusement le mélange dans un broyeur de tissus et centrifuger à 2 000 ***g*** pendant 30 min. Récolter le surnageant et répartir en aliquots pour stockage à –40 °C. L'antigène contient du virus vivant et ne devrait être manipulé que dans des locaux de niveau de confinement approprié, comme par exemple une enceinte de sécurité microbiologique de classe II. Si nécessaire, l'antigène peut être inactivé avant d'être réparti : ajouter 0,3 % (vol/vol) de β-propiolactone au surnageant récolté à l'issue de la centrifugation, et incuber 2 h supplémentaires à 37 °C. Il est important que cette incubation ait lieu sur un agitateur orbital ou un mélangeur rotatif, de façon à ce que la β propiolactone accède à toutes les surfaces internes du récipient qui ont été au contact du virus vivant. Répartir et stocker comme ci-dessus. Contrôler l'efficacité du processus d'inactivation en essayant de réisoler l'IBDV à partir de l'antigène inactivé, par trois passages sériés sur œuf embryonné (voir paragraphe B 1 g).

- **Préparation du sérum témoin positif**

Inoculer des poulets sensibles âgés de 4 à 5 semaines, par gouttes dans l'œil, avec 0,05 ml d'une suspension clarifiée d'homogénat bursal (10 % poids/vol) connue pour contenir des particules viables d'IBDV[1]. Saigner les animaux 28 jours après inoculation. Mélanger les sérums, répartir et stocker les aliquots à –20 °C.

- **Préparation de la gélose**

Dissoudre du chlorure de sodium (80 g) et du phénol (5 g) dans de l'eau distillée (1 litre) (attention : le phénol est toxique et devrait être manipulé et éliminé en conséquence). Ajouter l'agar (12,5 g) et chauffer jusqu'à dissolution complète de l'agar. Afin d'éviter l'utilisation du phénol, qui est à l'origine d'un risque pour

1 La souche classique d'IBDV 52/70 (sérotype 1, pathotype classique) est appropriée et peut être obtenue auprès de l'un des Laboratoires de référence de l'OIE (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre)*.

la santé du manipulateur et pour l'environnement, une autre recette pouvant être utilisée pour la préparation de la gélose est la suivante : chlorure de sodium (80 g), dihydrogénophosphate de potassium (0,45 g), hydrogénophosphate de sodium dihydrate (1,19 g), agar (10 g) et eau distillée qsp 1 litre (pH final = 7,1 entre 20 et 25 °C). Cette recette peut être homogénéisée par chauffage à 90 °C sous agitation. Pendant que le mélange est encore très chaud, filtrer à travers un tampon de bourre de cellulose enveloppé de quelques couches de gaze et répartir sous 20 ml en bouteilles de verre. Le milieu sans phénol peut être stérilisé à l'autoclave à (au plus) 115 °C pendant 15 min. Stocker les bouteilles à 4 °C jusqu'à utilisation.

- **Protocole**

i) Préparer les plaques de géloses au moins 24 h et au plus 7 jours avant utilisation. Faire fondre la gélose en chauffant les bouteilles à la vapeur ou au bain-marie bouillant. Prendre soin que l'eau ne puisse entrer dans les bouteilles.

ii) Verser le contenu d'une bouteille dans chacune des boîtes de Petri de diamètre 9 cm, placées sur une surface horizontale. Préparer autant de boîtes de Petri que nécessaire. Certains laboratoires préparent la gélose sur des lames de verre pour microscopie (25 × 75 mm, la gélose devant avoir 3 mm d'épaisseur).

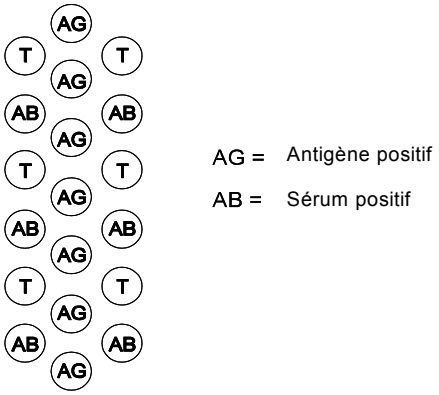

Fig. 1. Position des puits pour recherche d'anticorps (T = sérums à tester)

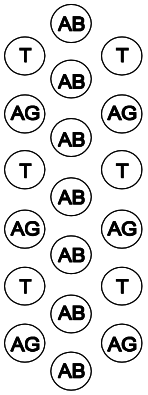

Fig. 2 Position des puits pour recherche d'antigènes (T = tissus à tester)

Notes :

1. Une disposition en ligne des puits est préférable mais une disposition hexagonale peut aussi être utilisée. Chaque sérum ou fragment de bourse de Fabricius testé devrait être déposé dans un puits, selon le cas, soit adjacent à un autre puits contenant le sérum positif de référence (AB), soit adjacent à un autre puits contenant l'antigène positif de référence (AG).
2. Les puits utilisés sont profonds de 3 mm, ont un diamètre de 6 mm et sont séparés par une distance de 3 mm (d'autres dimensions dont on aurait préalablement démontré l'efficacité peuvent être utilisées).

iii) Couvrir les plaques et laisser la gélose solidifier, puis stocker à 4 °C pendant au plus 7 jours (Si les boîtes doivent être utilisées le jour même où elles sont coulées, les sécher en les plaçant ouvertes mais retournées pendant 30 min à 1 h dans une étuve à 37 °C).

iv) Découper trois rangées verticales de puits d'un diamètre de 6 mm, séparés les uns des autres par un espace de 3 mm, à l'aide d'un emporte pièce et d'un schéma permettant de repérer la disposition des puits.

v) Enlever le bouchon de gélose des puits avec une pompe à vide, ou avec une plume d'acier montée, en prenant garde de ne pas endommager les parois des puits.

vi) Avec une pipette, distribuer 50 µl des sérums à tester dans les puits comme indiqué à la Figure 1.

Ou pour la détection des antigènes de l'IBDV dans les tissus bursaux.

Déposer dans les puits, à l'aide de pinces bruxelles à mors recourbés, de petits fragments de tissus finement hachés, comme indiqué à la Figure 2, de sorte que les puits soient exactement remplis. L'exsudat de congélation-décongélation des tissus hachés peut aussi être utilisé pour remplir les puits.

vii) Distribuer 50 µl des réactifs témoins positif et négatif dans les puits appropriés.

viii) Incuber les boîtes entre 22 et 37 °C pendant au plus 48 h, en chambre humide pour éviter le dessèchement de la gélose.

ix) Examiner les boîtes après 24 et 48 h, au dessus d'un fond sombre, en utilisant une source lumineuse oblique.

- **Variante quantitative de l'épreuve d'immunodiffusion en gélose**

L'épreuve d'IDG peut aussi être utilisée pour mesurer les niveaux immunitaires en utilisant des dilutions sériques dans les puits et en définissant le titre comme la plus forte dilution produisant une ligne de précipité (5). Cette approche peut être très utile pour mesurer les anticorps maternels ou vaccinaux et pour décider de la date optimale pour la vaccination, cette variante quantitative de l'épreuve d'IDG a maintenant été largement remplacée par l'utilisation de test ELISA.

b) Les tests de séroneutralisation virale

Le test de SN est réalisé en culture cellulaire. Le test est plus compliqué et plus coûteux que l'épreuve IDG, mais il est plus sensible pour détecter les anticorps. Cette sensibilité n'est pas nécessaire pour le diagnostic de routine, mais peut s'avérer utile pour évaluer les réponses vaccinales ou pour différencier les réponses immunitaires induites par les sérotypes 1 et 2 de l'IBDV.

Tout d'abord, une suspension virale est préparée dans du milieu de culture cellulaire et son titre est ajusté de façon à contenir 100 $DICT_{50}$ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) sous 0,05 ml (Spearman–Kärber [1] ou Reed & Muench [30]). Cette suspension est distribuée à raison de 0,05 ml dans chaque puits d'une microplaque de qualité adaptée à la culture cellulaire. Les sérums à tester sont inactivés par chauffage à 56 °C pendant 30 min. Des dilutions sériées de 1/2 en 1/2 des sérums à tester sont préparées dans la suspension virale diluée. Après 30 min à température ambiante, 0,2 ml d'une suspension de fibroblastes d'embryons de poulets EAPS sont ajoutés à chaque puits. La densité de cette suspension cellulaire doit être suffisante pour que des tapis cellulaires confluents soient obtenus après 24 h d'incubation. Les plaques sont scellées et incubée à 37 °C pendant 4 à 5 jours, période à l'issue de laquelle les tapis cellulaires sont observés au microscope pour mise en évidence de l'ECP caractéristique de l'IBDV. La dilution limite (ou titre sérique) est exprimée comme la réciproque de la plus forte dilution virale n'ayant pas permis de détecter l'ECP. Pour limiter les variations liées à la réalisation de tests successifs ou à des manipulateurs différents, un sérum de référence de titre neutralisant connu peut être inclus dans chaque série de tests[2] et le titre de la suspension virale doit être déterminé à chaque nouvelle manipulation en utilisant un nombre de puits suffisant pour chaque dilution virale.

c) Méthodes immuno-enzymatiques

Les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) sont utilisées pour la détection des anticorps induits par l'IBDV. La sensibilisation des plaques requiert une préparation virale purifiée, ou pour le moins semi-purifiée, ce qui nécessite des soins et des techniques particuliers. Les méthodes pour la préparation des réactifs et la mise en œuvre de l'épreuve ont été décrites par Marquardt *et al.* en 1980 (26). Des kits de diagnostic commerciaux sont disponibles.

Les sérums à tester sont dilués selon le protocole pré-établi ou le mode d'emploi du kit de diagnostic utilisée, et chaque sérum est déposé dans le nombre requis de puits. Après incubation dans les conditions appropriées, les sérums sont rejetés des plaques et les puits sont soigneusement lavés. Des anticorps anti-poulet couplés à une enzyme sont distribués dans les puits et les plaques sont à nouveau incubées dans les conditions appropriées. Les plaques sont vidées et lavées à nouveau avant que soit ajouté dans les puits de la plaque un substrat chromogène qui provoque un changement de couleur en présence de l'enzyme. À l'issue de l'étape finale d'incubation, la réaction du substrat chromogène est arrêtée par addition d'une solution de blocage appropriée et l'intensité des réactions colorées est quantifiée par la mesure de l'absorbance (densité optique) de chaque puits. Un ratio entre l'échantillon testé et le positif de référence (S/P) est calculé pour chaque échantillon.

d) Interprétation des résultats

L'épreuve d'IDG est étonnamment sensible, quoique moins sensible que le test de SN. Ce dernier produira souvent un titre neutralisant alors que l'épreuve d'IDG sera négative. Les réactions sérologiques positives chez des sujets non vaccinés et dépourvus d'anticorps d'origine maternelle indiquent une infection. À titre indicatif, une réaction positive dans l'épreuve d'IDG chez un sujet vacciné ou chez un jeune sujet porteur d'anticorps d'origine maternelle indique un niveau d'anticorps protecteurs. Les tests ELISA donnent des résultats plus rapides que les tests de SN et d'IDG, et sont moins coûteuses en termes de travail, bien que

2 Un antisérum approprié peut être obtenu auprès de l'un des Laboratoires de référence de l'OIE (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre)*.

les réactifs soient plus chers à l'achat. Les titres SN et IDG sont bien corrélés mais la SN est plus sensible et les titres IDG sont proportionnellement plus faibles. La corrélation entre l'ELISA et la SN, ou entre l'ELISA et l'IDG est plus variable et dépend de l'origine des réactifs ELISA. Lorsque l'on étudie la décroissance des anticorps d'origine maternelle, il n'est pas inhabituel de détecter des anticorps résiduels par SN à un âge auquel les résultats ELISA sont déjà négatifs. Une formule a été développée pour le calcul de l'âge optimal de vaccination (qui variera selon le vaccin utilisé) en fonction des titres ELISA (18). Des réactions positives non spécifiques peuvent être observées avec la plupart des tests ELISA car ceux-ci sont en général conçus pour suivre les réponses post vaccinales, situation dans laquelle la sensibilité est considérée comme plus importante que la spécificité. Cette propriété devrait être prise en compte lorsque les tests ELISA sont utilisés pour le diagnostic. Dans les troupeaux de poulets commerciaux, il ne peut être exclu que l'utilisation d'un antigène ELISA de sérotype 1 permette aussi la détection d'anticorps induits par une infection naturelle par un IBDV de sérotype 2, cependant cette éventuelle réactivité croisée n'a pas été signalée comme interférant avec les programmes de suivi sérologique de l'IBD en ELISA.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Deux types de vaccins sont pour l'essentiel disponibles pour maîtriser l'IBDV. Il s'agit des vaccins à virus vivants atténués, ou des vaccins à virus inactivé adjuvés avec un émulsifiant huileux (39). Un vaccin à virus vivant recombiné exprimant les antigènes de l'IBDV a également été autorisé (7).

Des recommandations pour la préparation des vaccins vétérinaires sont formulées au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les recommandations formulées ici ainsi qu'au Chapitre 1.1.8. ont une vocation générale et peuvent être complétées par des exigences nationales ou régionales.

À ce jour, les vaccins de l'IBD ont été préparés seulement avec des souches d'IBDV de sérotype 1, bien qu'un virus de sérotype 2 ait été détecté chez les volailles. Le virus de sérotype 2 n'a pas été décrit comme associé à une maladie, mais sa présence induira des anticorps. Les anticorps induits par le sérotype 2 ne confèrent aucune protection contre l'infection par les virus de sérotype 1 et n'interfèrent pas avec les réponses vaccinales aux virus de sérotype 1. Il y a eu de nombreuses descriptions de variants antigéniques des virus de sérotype 1 (31). Les études de protection croisée ont montré que des vaccins inactivés préparés à partir d'un virus « classique » de sérotype 1 doivent avoir un contenu antigénique important pour conférer une bonne protection vis-à-vis de certains de ces variants. Des vaccins de l'IBD contenant à la fois des souches classiques et des souches variantes du sérotype 1 sont maintenant autorisés. Des souches d'IBDV hypervirulentes (vvIBDV) porteuses de changements antigéniques limités par rapport aux virus classiques de sérotype 1 sont apparues depuis 1986. Une immunisation active à l'aide d'une souche virale ou vaccinale « classique » de sérotype 1 procure une protection efficace contre les vvIBDV (16), ceux-ci sont toutefois moins sensibles que les virus pathogènes « classiques » du sérotype 1 à la neutralisation par les anticorps d'origine maternelle (42).

• Modalités d'emploi des vaccins vivants

Les vaccins vivants de l'IBD sont produits à partir de souches virales totalement ou partiellement atténuées et qualifiées de « douces », « d'intermédiaires » ou « d'intermédiaires plus » (également dites « chaudes »).

Les vaccins « doux » ou « intermédiaires » sont utilisés chez les reproducteurs pour induire une réponse primaire avant qu'une vaccination de rappel soit réalisée juste avant l'entrée en ponte à l'aide d'un vaccin à virus inactivé. Les vaccins « doux » ou « intermédiaires » sont sensibles à la neutralisation par les anticorps d'origine maternelle et ne devraient par conséquent être administrés qu'une fois que ceux-ci ont disparu. Les vaccins sont administrés par injection intramusculaire, par nébulisation ou dans l'eau de boisson, en général à l'âge de 8 semaines (34).

Les vaccins « intermédiaires » ou « intermédiaires plus » sont utilisés pour les poulets de chair et les poulettes futures pondeuses d'œuf de consommation. Certains de ces vaccins sont également utilisés chez les jeunes futurs reproducteurs s'il y a un risque important d'infection spontanée par une souche pathogène d'IBDV. Bien que les vaccins intermédiaires soient sensibles à la présence d'anticorps d'origine maternelle, ils sont parfois administrés à l'âge de 1 jour, par nébulisation, pour protéger les sujets du troupeau qui pourraient être dépourvus d'anticorps d'origine maternelle ou n'en avoir que des quantités minimes. Cette approche permet aussi de constituer un réservoir de virus vaccinal au sein du lot, ce qui autorise ensuite une transmission horizontale aux autres sujets quand leur taux d'anticorps d'origine maternelle décroît. Une deuxième et troisième vaccination sont en général administrées, tout particulièrement lorsqu'il y a un risque important d'exposition aux formes virulentes de la maladie, ou lorsque les sujets vaccinés présentent des niveaux hétérogènes d'anticorps d'origine maternelle. La date d'application de ces vaccinations supplémentaires dépend du titre en anticorps des poules reproductrices lorsque les œufs ont été pondus. À titre d'exemple, la deuxième dose est en général administrée entre 10 et 14 jours d'âge, alors que 10 % du lot est sensible à l'IBD, et la troisième dose est administrée 7 à 10 jours plus tard. La voie d'administration est la nébulisation ou l'eau de boisson. L'injection intramusculaire ou

la goutte dans l'œil sont rarement utilisées. Lorsque le vaccin est administré dans l'eau de boisson, il importe d'utiliser de l'eau propre, de pH neutre, sans odeur ou résidus chlorés ou métalliques. De la poudre de lait écrémé peut être ajoutée à raison de 2 g par litre. Il faut veiller à ce que tous les oiseaux reçoivent leur dose de vaccin. Dans ce but, l'adduction d'eau doit être coupée 2 à 3 h avant la mise à disposition de la suspension vaccinale et il faut veiller à ce qu'il ne reste pas d'eau dans les canalisations de distribution ou les abreuvoirs. Il est possible de diviser le volume total de suspension vaccinale en deux moitiés, et de distribuer la seconde moitié du volume 30 min après la première.

Une technologie de développement récent consiste à administrer le vaccin dans les œufs pendant la période d'incubation. Le virus vaccinal vivant est mélangé à des anticorps anti-IBDV et le complexe antigène-anticorps est injecté *in ovo* au 18^{e} jour d'incubation. Les œufs sont ensuite amenés à éclosion et le vaccin se trouve libéré quand les poussins sont âgés d'environ 7 jours. De cette façon, le problème des anticorps d'origine maternelle se trouve contourné et les poussins sont immunisés efficacement (14).

Un vaccin à virus vivant recombiné qui utilise un virus comme vecteur (herpèsvirus de la dinde) pour exprimer la protéine VP2 de l'IBDV a été enregistré récemment en Europe pour les poulets. Il n'existe que peu d'informations disponibles concernant son utilisation.

Les vaccins vivants contre l'IBD sont dans l'ensemble considérés comme compatibles avec les autres vaccins aviaires. Il est toutefois possible que les vaccins contre l'IBD qui induisent des lésions de la bourse de Fabricius, puissent interférer avec la réponse aux autres vaccins. La vaccination doit être réservée aux animaux en bonne santé. Les ampoules de vaccin lyophilisé doivent être conservées à une température comprise entre 2 et 8 °C jusqu'au moment de l'utilisation.

- **Vaccins à virus inactivés : conditions d'emploi**

Les vaccins à virus inactivés contre l'IBD sont principalement utilisés pour induire des taux d'anticorps élevés, durables et homogènes chez les poules reproductrices qui ont été précédemment primo-immunisées durant la période d'élevage, soit par l'administration d'un vaccin vivant, soit par une exposition naturelle à un virus sauvage (6). Le programme habituel consiste à administrer le vaccin vivant à environ 8 semaines d'âge, puis le vaccin à virus inactivé entre 16 et 20 semaines. De façon plus occasionnelle, les vaccins à virus inactivés peuvent être inclus dans des programmes combinant l'utilisation de vaccins à virus vivants et à virus inactivés, chez des jeunes sujets de valeur, porteurs de quantités importantes d'anticorps d'origine maternelle et élevés dans des zones où le risque d'exposition à des IBDV virulents est important. Les vaccins inactivés sont produits sous la forme d'émulsions « eau-dans-l'huile » et doivent être injectés individuellement à chaque oiseau. Les voies d'administration à privilégier sont la voie intramusculaire dans les muscles de la patte, en évitant la proximité des articulations, des tendons et des principaux vaisseaux sanguins, ou la voie sous-cutanée. Une seringue automatique mutlidose peut être utilisée. La totalité de l'équipement doit être nettoyée et stérilisée entre chaque lot, et les équipes de vaccination doivent mettre en œuvre des règles d'hygiène strictes lorsqu'elles passent d'un lot à un autre. Le vaccin doit être stocké à une température comprise entre 4 et 8 °C. Il ne doit pas être congelé, ni exposé à une lumière intense ou à des températures élevées.

Seuls les oiseaux en bonne santé, dont on sait qu'ils ont été sensibilisés par une exposition préalable à l'IBDV, devraient être vaccinés. Utilisé de cette façon, le vaccin devrait induire une réponse immunitaire suffisamment bonne pour que les poussins issus de tels parents héritent d'une protection passive suffisante pour les protéger contre l'IBD jusqu'à l'âge d'environ 30 jours (45). Cette durée couvre la période de plus grande sensibilité à la maladie et prémunit contre les lésions de la bourse à un âge où elles pourraient provoquer une immunodépression. Il a été démontré que les lésions bursales survenant après l'âge de 15 jours ont peu d'effet sur l'immunocompétence car à cet âge les cellules immunocompétentes ont migré vers les tissus lymphoïdes périphériques. Cependant, s'il y a un risque d'infection par les souches très virulentes de l'IBDV, il convient d'appliquer des vaccins vivants de l'IBD selon les principes décrits ci-dessus. Le niveau précis et la durée de l'immunité conférée par les vaccins à virus inactivés dépendront principalement de la concentration antigénique présente dans chaque dose. L'objectif de production devrait être d'obtenir une concentration antigénique élevée et donc un vaccin hautement immunogène.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

- **Vaccin à virus vivant**

Il faut démontrer que la semence virale est exempte d'agents étrangers tels que virus, bactéries, mycoplasmes et moisissures, et tout particulièrement d'agents pathogènes pour les oiseaux. Ceci inclut l'absence de contamination par d'autres souches d'IBDV que la souche vaccinale. Pour les souches vaccinales censées être atténuées et non immunodépressives, le virus du lot de semence doit s'avérer

stable, sans tendance à la réversion vers la virulence. Cette stabilité peut être démontrée en réalisant au moins 5 passages consécutifs de poulet à poulet, à 3 ou 4 jours d'intervalle, en utilisant une suspension bursale comme inoculum, chez des poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiés de l'âge minimum requis pour la vaccination. On doit démontrer que le virus a effectivement été transmis. Une étude histologique comparative est ensuite réalisée pour montrer qu'il n'y a pas de différence entre les bourses des sujets inoculés avec le matériel initial et celle des sujets ayant reçu le matériel inoculé au dernier passage. Des scores lésionnels (29) et des techniques d'imagerie ont été développés.

Mesure du pouvoir immunodépresseur : une caractéristique importante du virus est qu'il ne devrait pas causer de lésions bursales qui pourraient provoquer une immunodépression chez des sujets sensibles. Des vaccins vivants de type « intermédiaire » ou « intermédiaire plus » peuvent être autorisés bien qu'ils puissent s'avérer capables d'induire une immunodépression. Un protocole éventuel pour l'évaluation expérimentale de l'effet immunodépresseur est le suivant : le vaccin de la bursite infectieuse est administré par injection ou par goutte dans l'œil, une dose recommandée par sujet, à 20 poulets EAPS âgés d'un jour. Un autre groupe de poulets de même âge et de même origine est hébergé séparément à titre de témoin. À l'âge de 2 semaines, chaque sujet dans chaque groupe reçoit une dose (telle que définie par le fabriquant) d'un vaccin vivant de la maladie de Newcastle, administré par goutte dans l'œil. Un autre protocole possible consiste à administrer le vaccin de la bursite infectieuse à l'âge minimum recommandé par le fabriquant, puis le vaccin de la maladie de Newcastle à l'âge auquel les lésions de la bourse de Fabricius induites par le vaccin de la bursite infectieuse sont maximales. Le titre en anticorps inhibant l'hémagglutination (IHA) est mesuré en réponse au vaccin de la maladie de Newcastle chez chaque sujet, 2 semaines après l'administration de ce vaccin, et la protection conférée est mesurée après une épreuve virulente réalisée avec une dose comprise entre $10^{5,0}$ et $10^{6,5}$ DLE_{50} (doses létales médianes pour l'embryon) de la souche Herts 33/56 (ou d'une souche virale équivalente) du virus de la maladie de Newcastle. Le vaccin de la bursite infectieuse ne satisfait pas aux exigences du test si la réponse IHA et la protection induites par le vaccin de la maladie de Newcastle sont significativement inférieures ($p < 0,01$) dans le groupe qui a reçu le vaccin de la bursite infectieuse, comparé au groupe témoin. Dans les pays exempts de maladie de Newcastle, un autre protocole possible est d'utiliser des globules rouges de mouton, ou une suspension inactivée de *Brucella abortus* comme antigène, en mesurant ensuite les réponses en anticoprs respectivement à l'aide de l'épreuve d'hémagglutination ou de l'épreuve de séro-agglutination. Toutefois, l'utilisation d'un autre vaccin vivant constitue un système révélateur préférable dans la mesure où il permet aussi d'évaluer l'immunité à médiation cellulaire.

- **Vaccins à virus inactivés**

Pour les vaccins à virus inactivés, les caractéristiques les plus importantes sont un contenu antigénique important et un bon pouvoir immunogène. Des souches virales pathogènes ou atténuées ont été utilisées. Il doit être démontré que le lot de semence virale est exempt de virus, bactéries, mycoplasmes et moisissures et tout particulièrement exempt d'agents pathogènes pour les oiseaux (38).

b) Méthode de culture

Le virus de semence peut être propagé en utilisant différents systèmes culturaux, tels que les cultures de fibroblastes d'embryon de poulet EAPS, ou les œufs de poule embryonnés. Dans certains cas, la propagation sur poulet (récolte des bourses de Fabricius) peut être utilisée. Le stock est distribué en parties aliquotes qui sont lyophilisées en ampoules scellées. Il a été prétendu que les vaccins fabriqués à partir de tissu de bourses sont de meilleurs immunogènes que les vaccins de culture. En fait, il a été démontré par des études en conditions contrôlées que les deux types de vaccin induisent la même réponse immunitaire pour autant qu'ils contiennent la même quantité d'antigènes.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Des données sur l'efficacité devraient être obtenues avant que la production à large échelle du vaccin ne soit entreprise. Le vaccin devrait être administré aux oiseaux en utilisant la méthode d'administration qui sera utilisée sur le terrain. Les vaccins à virus vivants peuvent être administrés à de jeunes oiseaux et la réponse de ces derniers mesurée par une épreuve sérologique ou par résistance à une épreuve expérimentale. Dans le cas des vaccins à virus inactivés, une épreuve doit être réalisée chez des oiseaux plus âgés qui vont entrer en ponte, en suivant le protocole de vaccination recommandé par le fabriquant, de façon à ce que la descendance des sujets vaccinés puisse être testée dans le but d'évaluer la protection conférée par les anticorps d'origine maternelle au début et à la fin de la période de ponte.

- **Vaccin à virus vivant**

Test d'efficacité : administrer une dose de vaccin contenant le titre viral minimum recommandé à chaque poulet EAPS d'un groupe de 20 sujets ayant l'âge minimum recommandé pour la vaccination. Inoculer un groupe séparé pour chacune des voies d'administration recommandées. Conserver 20 sujets issus de la

même éclosion pour constituer un lot témoin non inoculé. Après 14 jours, éprouver chacun des poulets par instillation intra-oculaire avec environ 100 DIP_{50} (Dose de virus infectant 50 % des poulets) d'une souche d'IBDV pathogène choisie selon les recommandations de l'un des Laboratoires de référence de l'OIE pour l'IBD (se reporter à la liste de la Partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Observer les poulets quotidiennement pendant 10 jours. Enregistrer le nombre de poulets qui meurent ou présentent des signes cliniques d'IBD. Réaliser un examen histologique de la bourse de Fabricius chez les sujets survivant au 10e jour après inoculation. Le vaccin satisfait aux exigences du test si au moins 90 % des poulets vaccinés survivent sans présenter de symptômes ou de lésions sévères de la bourse de Fabricius à l'issue de la période d'observation. L'essai n'est pas validé si plus de la moitié des témoins éprouvés ne présentent pas de symptômes d'IBD, ou si un (ou plusieurs) des poulets témoins ne présente(nt) pas de lésions sévères de la bourse de Fabricius, ou si les sujets témoins ou inoculés meurent pour des raisons non attribuables au test. Les lésions de la bourse de Fabricius sont considérées comme sévères si au moins 90 % des follicules présentent au moins 75 % de déplétion lymphocytaire. Sous réserve que ses résultats soient satisfaisants, ce test peut n'être réalisé que sur un seul des lots dérivés d'un même lot de semence.

- **Vaccins à virus inactivés**

Test d'efficacité : un premier protocole est d'utiliser au moins 20 oiseaux EAPS non primo-immunisés qui reçoivent chacun une dose, de vaccin à un âge de vaccination (proche de l'entrée en ponte) et selon une voie d'administration recommandée ; un protocole alternatif est de tester une dose de vaccin par voie d'administration recommandée en utilisant 20 oiseaux EAPS non primo-immunisés. La réponse en anticorps est mesurée entre 4 et 6 semaines après la vaccination, par SN, par comparaison à un sérum de référence[3].

Les œufs sont collectés en vue de l'éclosion 5 à 7 semaines après la vaccination, et 25 des poussins qui en sont issus sont éprouvés à l'âge de 3 semaines par instillation intra-oculaire avec environ 100 DIP_{50} d'une souche pathogène reconnue du virus de la bursite infectieuse. 10 poulets témoins de même souche génétique mais issus de parents non vaccinés sont aussi éprouvés. La protection est évaluée 3 à 4 jours après l'épreuve, en prélevant la bourse de Fabricius de chaque oiseau, chaque bourse étant ensuite soumise à un examen histologique ou à une recherche des antigènes viraux par l'épreuve d'IDG. Pas plus de trois sujets issus des parents vaccinés devraient présenter des résultats témoignant d'une infection par l'IBDV, alors que tous les poulets issus des parents non vaccinés devraient être infectés.

Ce protocole devrait être répété à l'approche de la fin de la période de ponte quand les reproductrices vaccinées ont au moins 60 semaines, mais dans ce cas les poussins issus devraient être éprouvés à l'âge de 15 jours.

Le test d'efficacité devrait être répété sur des sujets primo-immunisés ensuite vaccinés selon le programme recommandé. La dose de vaccin à virus inactivé finalement utilisée doit être administrée à l'âge minimum recommandé pour la vaccination. Les poulets éclos des œufs collectés en début et en fin de période de ponte sont testés, pour ce qui concerne la protection, selon le protocole décrit ci-dessus.

Ces tests peuvent n'être réalisés qu'une seule fois en utilisant un lot de vaccin représentatif.

2. Méthodes de fabrication

Le vaccin doit être produit dans des locaux adaptés propres et sécurisés, bien séparés des zones où sont réalisées les activités de diagnostic ou des zones d'élevage commercial des volailles.

La production du vaccin devrait être basée sur un système « semence-lot » en utilisant une souche virale adaptée d'origine et d'historique de propagation connus. Des œufs EAPS doivent être utilisés pour tous les réactifs employés lors de la propagation ou du testage du vaccin. Les vaccins à virus vivants sont produits par culture sur œuf ou culture cellulaire. Les vaccins à virus inactivés sont produits soit à partir de virus pathogènes cultivés sur la bourse de Fabricius de jeunes oiseaux, soit à partir de virus atténués adaptés à la propagation au laboratoire et multipliés sur culture cellulaire ou sur œuf embryonné. Un titre viral élevé est nécessaire. Ces vaccins sont formulés sous la forme d'émulsions « eau dans l'huile ». Un exemple typique de formulation consiste à mélanger 80 % d'huile minérale à 20 % d'une suspension aqueuse d'homogénat bursal, en présence d'agents émulsifiants adaptés.

3. Contrôles en cours de fabrication

Contenu antigénique : une fois le virus cultivé jusqu'à un titre viral élevé, celui-ci devrait être évalué sur cultures cellulaires, œuf embryonné ou sur poulets, selon ce qui est le plus adapté à la souche virale utilisée. La

3 Voir la note de bas de page n°2

détermination du contenu antigénique requis pour produire des lots de vaccins satisfaisants repose sur l'étude de vaccins expérimentaux dont on a démontré l'efficacité dans des essais de laboratoire et de terrain.

Inactivation des vaccins à virus inactivés : elle est souvent réalisée soit avec la β-propiolactone soit avec le formol. On doit avoir démontré que dans les conditions de production du vaccin, l'agent inactivant et la procédure d'inactivation inactivent efficacement le virus vaccinal et tout agent contaminant, par exemple bactérien, qui pourrait être présent dans les réactifs de départ.

Avant inactivation, il convient de s'assurer que la suspension virale est homogène et exempte de particules à l'intérieur desquelles l'agent inactivant pourrait ne pas accéder. L'inactivation du vaccin doit être vérifiée par un test pratiqué sur chaque lot dérivé de la récolte à grande échelle ainsi que sur le produit final. Une autre approche consiste à vérifier l'inactivation soit sur l'un ou sur l'autre mais pas sur les deux. Le test choisi doit être adapté à la souche vaccinale qui est utilisée et devrait consister en au moins deux passages sériés sur cultures cellulaires, œufs embryonnés ou poulets sensibles, avec dix répétitions par passage. Aucune présence d'un quelconque virus ou microorganisme vivant ne devrait être détectée.

Stérilité des vaccins à virus inactivés : l'huile minérale incorporée dans le vaccin doit être stérilisée par chauffage à 160 °C pendant 1 h, ou par filtration, et l'efficacité du protocole de stérilisation doit avoir été démontrée. Les tests adaptés à l'étude des vaccins à virus inactivés doivent être pratiqués sur chaque lot du produit fini, ainsi que décrit par exemple dans la Pharmacopée Européenne.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests destinés à démontrer la stérilité et l'absence de contamination par des éléments biologiques sont décrits au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

- **Innocuité des vaccins à virus vivants**

Dix doses recommandées du vaccin sont administrées par instillation intra-oculaire à chacun des sujets d'un groupe de 15 poulets EAPS de l'âge minimum recommandé pour la vaccination et d'un âge maximum de 2 semaines. Les poulets sont observés pendant 21 jours. Si plus de deux poulets meurent de causes non liées au vaccin, le test doit être répété. Le vaccin ne satisfait pas aux exigences du test si un (ou plusieurs) poulet(s) meur(en)t ou présente(nt) des symptômes attribuables au vaccin. Le test est répété sur chaque lot du vaccin arrivé au stade « produit fini ».

- **Innocuité des vaccins à virus inactivé**

Dix poulets EAPS, âgés de 14 à 28 jours, sont inoculés par les voies d'administration recommandées avec la dose recommandée ou une dose double de celle-ci. Les oiseaux sont observés pendant 3 semaines. Aucune réaction anormale, locale ou systémique, ne devrait se développer. Le test est répété sur chaque lot du vaccin arrivé au stade « produit fini ».

c) Activité

- **Test d'activité des vaccins à virus vivant**

Un test d'activité (titrage viral) doit être réalisé sur œufs embryonnés ou cultures cellulaires pour chaque lot de vaccin produit. De surcroît, la méthode décrite au paragraphe C.1.c « Vaccin à virus vivant (test d'efficacité) » doit être pratiquée sur un lot représentatif de l'ensemble de tous les lots produits à partir du même lot de semence.

- **Test d'activité des vaccins à virus inactivé**

Dix poulets EAPS, âgés d'environ 4 semaines, sont chacun vaccinés avec une dose de vaccin administrée par la voie recommandée. Dix autres poulets témoins de la même origine et du même âge sont hébergés avec les sujets vaccinés. La réponse sérologique de chaque poulet est déterminée 4 à 6 semaines après vaccination, à l'aide d'un test de SN en faisant référence à un antisérum de référence inclus à titre de témoin. Le niveau moyen des anticorps chez les sujets vaccinés ne devrait pas être significativement inférieur à celui mesuré lors du test de protection. Aucun anticorps ne devrait être détecté chez les sujets témoins non vaccinés. Ce test doit être répété sur chaque lot du vaccin arrivé au stade « produit fini ».

d) Stabilité

Il conviendrait de démontrer sur trois lots du vaccin que celui ci satisfait encore le test d'activité de lot lorsque le vaccin a été stocké pendant une durée excédant de 3 mois sa date de péremption.

e) Agents de conservation

Un agent de conservation est en général nécessaire pour les vaccins présentés en flacons multidoses. La concentration de l'agent de conservation dans le vaccin arrivé au stade « produit fini » et sa persistance au cours du stockage et jusqu'à péremption devraient être vérifiées. Un agent de conservation adapté, ayant déjà fait ses preuves pour une telle utilisation, devrait être utilisé.

f) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins en émulsion huileuse provoquent, s'ils sont accidentellement injectés dans la main ou dans d'autres tissus, des blessures graves chez le personnel réalisant la vaccination. Dans le cas d'un tel accident, la personne blessée devrait être conduite immédiatement à l'hôpital et emporter avec elle l'emballage du vaccin. L'étiquette de chaque bouteille de vaccin et chaque emballage devraient comporter une mention claire avertissant l'utilisateur des conséquences graves des blessures qu'il est susceptible de s'infliger. De telles blessures devraient être traitées par le service médical d'urgence comme celles infligées dans l'industrie par les pistolets graisseurs.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir paragraphe C.4.b.

b) Activité

Voir paragraphe C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS (1998). Chapter 43. *In:* Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fourth Edition. AAAP, University of Pennsylvania, New Bolton Center, Kenneth Square, PA 19348-1692, USA.

2. AZAD A.A, JAGADISH M.N., BROWN M.A. & HUDSON P.J. (1987). Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*, **161**, 145–152.

3. BROWN M.D., GREEN P. & SKINNER M.A. (1994). VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of classical strains. *J. Gen. Virol.*, **75**, 675–680.

4. BOOT H.J., TER HUURNE A.A., HOEKMAN A.J., PEETERS B.P., & GIELKENS A.L. (2000). Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J. Virol.,* **74**, 6701–6711.

5. CULLEN G.A. & WYETH P.J. (1975). Quantitation of antibodies to infectious bursal disease. *Vet. Rec.*, **97**, 315.

6. CULLEN G.A. & WYETH P.J. (1976). Response of growing chickens to an inactivated IBD antigen in oil emulsion. *Vet Rec.*, **99**, 418.

7. DARTEIL R., BUBLOT M., LAPLACE E., BOUQUET J.F., AUDONNET J.C. & RIVIÈRE M. (1995). Herpes virus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induces protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology*, **211**, 4781–4790.

8. DAVIS V. & BOYLE J.A. (1990). Random cDNA probes to infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, **34**, 329–335.

9. ETERRADOSSI N., ARNAULD C., TEKAIA F., TOQUIN D., LE COQ H., RIVALLAN G., GUITTET M., DOMENECH J., VAN DEN BERG T.P. & SKINNER M.A. (1999). Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. *Avian Pathol.*, **28**, 36–46.

10. ETERRADOSSI N., ARNAULD C., TOQUIN D. & RIVALLAN G. (1998). Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch. Virol.*, **143**, 1627–1636.

11. ETERRADOSSI N., PICAULT J.P., DROUIN P., GUITTET M., L'HOSPITALIER R. & BENNEJEAN G. (1992). Pathogenicity and preliminary antigenic characterization of six infectious bursal disease virus strains isolated in France from acute outbreaks. *J. Vet. Med.* [B], **39**, 683–691.

12. ETERRADOSSI N., RIVALLAN G., TOQUIN D. & GUITTET M. (1997). Limited antigenic variation among recent infectious bursal disease virus isolates from France. *Arch. Virol*., **142**, 2079–2087.

13. FAHEY K.J., MCWATERS P., BROWN M.A., ERNY K., MURPHY V.J. & HEWISH D.R. (1991). Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. *Avian Dis*., **35**, 365–373.

14. HADDAD E.E., WHITFILL C.E., AVAKIAN A.P., RICKS C.A., ANDREWS P.D., THOMA J.A. & WAKENELL P.S. (1997). Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis.,* **41**, 882–889.

15. JACKWOOD D.H. & SAIF Y.M. (1987). Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.,* **31**, 766–770.

16. JACKWOOD D.J. (1990). Development and characterization of nucleic acid probes to infectious bursal disease viruses. *Vet. Microbiol.,* **24**, 253–260.

17. JACKWOOD D.J. & JACKWOOD R.J. (1997). Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. *Avian Dis.,* **41**, 97–104.

18. KOUWENHOVEN B. & VAN DER BOS J. (1993). Control of very virulent infectious bursal disease (Gumboro disease) in the Netherlands with so called 'hot' vaccines. Proceedings of the 42nd Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, USA, 37–39.

19. KWANG M.J., LU Y.S., LEE L.H., LIN D.F., LIAO Y.K. LEE C. & LEE Y.L. (1987). Detection of infectious bursal disease viral antigen prepared from the cloacal bursa by ELISA. *J. Chin. Soc. Vet. Sci*., **13**, 265–269.

20. LASHER H.N. & SHANE S.M. (1994). Infectious bursal disease. *World's Poult. Sci*., **50**, 133–166.

21. LE NOUEN C., RIVALLAN G., TOQUIN D., DARLU P., MORIN Y., BEVEN V., DE BOISSESON C., CAZABAN C., GARDIN Y. & ETERRADOSSI N. (2006). Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment B-reassorted isolate. *J. Gen. Virol.,* **87**, 209–216.

22. LE NOUEN C., RIVALLAN G., TOQUIN D. & ETERRADOSSI N. (2005). Significance of the genetic relationships deduced from partial nucleotide sequencing of infectious bursal disease virus genome segments A or B. *Arch. Virol.,* **150**, 313–325.

23. LIM B.L., CAO Y., YU T. & MO C.W. (1999). Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284. *J. Virol*., **73**, 2854–2862.

24. LIN Z., KATO A., OTAKI Y., NAKAMURA T., SASMAZ E. & UEDA S. (1993). Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis*., **37**, 315–323.

25. LUKERT P.D. & SAIF Y.M. (1997). Infectious bursal disease. *In:* Diseases of Poultry, Tenth Edition, Calnek B.W., ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 721–738.

26. MARQUARDT W.W., JOHNSON R.B., ODENWALD W.F. & SCHLOTTHOKEN B.A. (1980). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis*., **24**, 375–385.

27. MEULEMANS G., ANTOINE O. & HALEN P. (1977). Application de l'immunofluorescence au diagnostic de la Maladie de Gumboro. *OIE Bull.*, **88**, 225–229.

28. MUNDT E. (1999). Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J. Gen. Virol.,* **80**, 2067–2076.

29. MUSKETT J.C., HOPKINS I.G., EDWARDS K.R. & THORNTON D.H. (1979). Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Vet. Rec.*, **104**, 332–334.

30. REED L.J. & MUENCH H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.,* **27**, 493–497.

31. ROSENBERGER J.K. & CLOUD S.S (1986). Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., **189**, 357.

32. ROSENBERGER J.K., KLOPP S., ECKROADE R.J. & KRAUSS W.C. (1975). The role of the infectious bursal agent and several adenoviruses in the hemorrhagic-aplastic anaemia syndrome and gangrenous dermatitis. *Avian Dis.,* **19**, 717–729.

33. SCHNITZLER D., BERNSTEIN F., MÜLLER H. & BECHT H. (1993). The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol*., **74**, 1563–1571.

34. SKEELES J.K., LUKERT P.D., FLETCHER O.J. & LEONARD J.D. (1979). Immunisation studies with a cell-culture adapted infectious bursal virus. *Avian Dis*., **23**, 456–465.

35. SMILEY J.R., SOMMER S.E. & JACKWOOD D.J. (1999). Development of a ssRNA internal control reagent for an infectious bursal disease virus reverse transcription / polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism diagnostic assay. *J. Vet. Diagn. Invest*., **11**, 497–504.

36. SNYDER D.B., LANA D.P., SAVAGE P.K., YANCEY F.S., MENGEL S.A. & MARQUARDT W.W. (1988). Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: Evidence for a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis*., **32**, 535–539.

37. SNYDER D.B., VAKHARIA V.N. & SAVAGE P.K. (1992). Naturally occuring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch. Virol*., **127**, 89–101.

38. THORNTON D.H. & MUSKETT J.C. (1982). Quality control methods for inactivated infectious bursal disease vaccines. *Dev. Biol. Stand*., **51**, 235–241.

39. THORNTON D.H. & PATTISON M. (1975). Comparison of vaccines against infectious bursal disease. *J. Comp. Pathol.*, **85**, 597–610.

40. VAKHARIA V.N., HE J., AHAMED B. & SNYDER D.B. (1994). Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res.,* **31**, 265–273.

41. VAN DEN BERG T.P., GONZE M., MORALES D. & MEULEMANS G. (1996). Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. *Avian Pathol*., **25**, 751–768.

42. VAN DEN BERG T.P. & MEULEMANS G. (1991). Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol*., **20**, 409–421.

43. WU C.C., LIN T.L., ZHANG H.G., DAVIS V.S. & BOYLE J.A. (1992). Molecular detection of infectious bursal disease virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **36**, 221–226.

44. WU C.C., RUBINELLI P. & LIN T.L. (2007). Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, **51**, 515–526.

45. WYETH P.J. & CULLEN G.A. (1979). The use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial broiler parent chickens. *Vet. Rec*., **104**, 188–193.

46. ZIERENBERG K., RAUE R., & MULLER H. (2001). Rapid identification of very virulent strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathol.,* **30**, 55–62.

RÉFÉRENCES RÉCENTES

A. ETERRADOSSI N. (2001). Major advances in infectious bursal disease virus (IBDV) research since the first International IBDV/CIAV Symposium (Rauischolzhausen, Germany, 1994). Proceedings of the 2nd International Symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia, Kaleta E. & Heffels-Redmann U., eds. Rauischholzhauzen, Germany, 16–20 June 2001, 6–23.

B. VAN DEN BERG T.P. (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol*., **29**, 175–194.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la bursite infectieuse aviaire (ou maladie de Gumboro) (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).